



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona



# **EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL DURANTE LA FASE DE DESARROLLO DEL ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**Trabajo Final de Grado**

**Ingeniería de Sistemas Biológicos**

Autor: Cristina Rodríguez Marin

Tutor: Lourdes Reig

26 de Septiembre de 2016

---

## Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias a aquellas personas que me han apoyado durante toda la etapa universitaria y que han hecho que el camino fuera más ameno.

Agradecer a Juan Ramos y a Lourdes Reig, por la paciencia y el apoyo prestado durante todo el proceso de desarrollo de este trabajo, así como la confianza depositada en todo momento. También me gustaría dar las gracias a todo el equipo de Acuáticos del Animalario del Parque de Investigación Biomédica (PRBB), en especial a Rubén, Marc, Selena y Nolas, por estar siempre dispuestos a ayudarme.

Mención especial para Alejandro Valdivieso, investigador del Instituto de Ciencias del Mar (ICM) por la ayuda aportada para la realización de este trabajo.

Por último quisiera dar las gracias a mi familia y amigos, en especial a Marta, por apoyar mis ideas y estar siempre a mi lado.

Mis más sincero agradecimiento a todos y cada uno de ellos por su colaboración para hacer realidad este proyecto.

---

## Resumen

El zebrafish (*Danio rerio*) es un modelo de experimentación cada vez más utilizado, y en más campos de investigación, gracias a su fácil manipulación y cultivo. Es por eso que cada vez existen más publicaciones acerca de esta especie.

El principal objetivo de este estudio es ver el efecto que tiene un incremento de la temperatura durante la fase de desarrollo en la determinación sexual del zebrafish. Al mismo tiempo se ha estudiado si la temperatura afecta a su crecimiento. Además se han estudiado algunas características del dimorfismo sexual de esta especie. Todo el estudio se ha llevado a cabo en dos líneas wild-type, AB y Tübingen (TU). Son líneas que inicialmente fueron criadas para reducir la transmisión de mutaciones letales en embriones. Y por tanto, difieren en el genotipo.

Posteriormente a la aplicación de un incremento de temperatura, que va desde los 26-28°C hasta los 32°C, en diferentes rangos del desarrollo del zebrafish, se sexaron fenotípicamente e histológicamente, y se midieron la longitud total, la longitud estándar y el ancho de cada individuo.

Los resultados obtenidos nos muestran que el efecto que tiene la temperatura sobre la determinación sexual es muy leve y que dependiendo de la línea de experimentación puede tender hacia la masculinización, como en el caso de la línea AB, o a la feminización, como en la línea TU. En referencia al crecimiento, se ha observado que la temperatura no parece afectar a los parámetros de crecimiento estudiados. Por último, observando los resultados acerca del dimorfismo sexual podemos concluir que en la línea AB las características observadas en este estudio nos permiten diferenciar machos y hembras, pero en la línea TU parece que estas características no lo permiten.

Palabras clave: *Danio rerio*, determinación sexual, temperatura, crecimiento, dimorfismo sexual.

---

## Resum

El zebrafish (*Danio rerio*) és un model d'experimentació que cada cop és més utilitzat, i en més camps d'investigació, gràcies a la seva facilitat de manipulació i cultiu. És per això, que cada cop existeixen més publicacions sobre aquesta espècie.

El principal objectiu d'aquest estudi és veure l'efecte que té un augment de la temperatura durant la fase de desenvolupament en la determinació sexual del zebrafish. A més, s'ha estudiat l'efecte de la temperatura en el seu creixement, així mateix, s'han estudiat algunes característiques del dimorfisme sexual d'aquesta espècie. Tot l'estudi s'ha dut a terme en dues línies wild-type, AB i Tübingen (TU). Són línies que inicialment van ser criades per reduir la transmissió de mutacions letals en embrions. Així doncs, difereixen en el genotip.

Posteriorment a l'aplicació d'un increment de la temperatura, que va des dels 26-28°C als 32°C, en diferents períodes del desenvolupament del zebrafish, es van sexar fenotípicament i histològicament, i es van mesurar el pes, la longitud total, la longitud estàndard i l'ample de cada individu.

Els resultats obtinguts ens mostren que l'efecte que té la temperatura sobre la determinació sexual és molt lleuger i que depenent de la línia d'experimentació pot tendir a la masculinització, com és el cas de la línia AB, o a la feminització, com en la línia TU. Pel que fa referència al creixement, s'ha observat que la temperatura no sembla que afecti als paràmetres de creixement estudiats. Per últim, observant els resultats sobre el dimorfisme sexual podem concloure que a la línia AB les característiques observades en aquest estudi sí permeten diferenciar mascles i femelles, però a la línia TU sembla que aquestes característiques no ho permeten.

Paraules clau: *Danio rerio*, determinació sexual, temperatura, creixement, dimorfisme sexual.



---

## Abstract

The zebrafish (*Danio rerio*) is an experimental model that is increasingly being used thanks to its easy handling and cultivation, this is the reason why nowadays the studies published with this species has increased.

The main objective of this study is to observe the effect of an increase of temperature during the development phase in zebrafish sex determination. Furthermore, it has been studied whether the temperature affects their growth and it also has been studied the sexual dimorphism. All the study is performed with two wild-type lines, AB and Tübingen (TU). These lines were initially screened to reduce the transmission of embryonic lethal mutations.

After applying a temperature change in different ranges of the zebrafish development, they were sexed phenotypically, histologically, and also was measured the weight, the total length, the standard length and the width of each individual.

The results show that the effect of temperature on sex determination is very low and depending on the experimental line can move towards masculinization, as in the case of the AB line, or feminization, as in TU line. Referring to growth, it has been observed that the temperature do not affect to any of the growth parameters studied. Finally, regarding to the results about sexual dimorphism allow us to observe that in the AB line there features studied helped to differentiate between males and females, but in line TU seems that these features do not allow us to differentiate the sex.

Key words: *Danio rerio*, sexual determination, temperature, growth, sexual dimorphism.

---

## ÍNDICE

1. Introducción .....	4
1.1. <i>Danio rerio</i> .....	4
1.1.1. <i>Reproducción</i> .....	5
1.1.2. <i>Desarrollo</i> .....	6
1.2. Usos actuales en experimentación .....	7
1.2.1. <i>Líneas genéticas para experimentación</i> .....	8
1.3. Determinación sexual .....	8
1.3.1. <i>Determinación sexual en zebrafish</i> .....	9
2. Objetivos .....	9
3. Materiales y métodos .....	10
3.1. Diseño experimental .....	10
3.1.1. <i>Cruce y puesta</i> .....	11
3.1.2. <i>Cambio de temperatura</i> .....	12
3.1.3. <i>Crecimiento</i> .....	13
3.2. Recogida de datos .....	14
3.3. Análisis de datos .....	17
3.3.1. <i>Determinación sexual</i> .....	17
3.3.2. <i>Crecimiento</i> .....	17
3.3.3. <i>Dimorfismo sexual</i> .....	18
4. Resultados y discusión .....	18
4.1. Determinación sexual .....	18
4.2. Crecimiento .....	21
4.2.1. <i>Peso</i> .....	21
4.2.2. <i>Longitud</i> .....	22
4.2.3. <i>Ancho</i> .....	24
4.2.4. <i>Índice de Masa Corporal (IMC)</i> .....	25
4.3. Dimorfismo sexual .....	26
5. Conclusiones .....	28
6. Bibliografía .....	29
6.1. Referencias bibliográficas .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Fig. 1.1</b> Ejemplar adulto de zebrafish .....	4
<b>Fig. 1.2</b> Diferentes tipos de libreas de zebrafish .....	4
<b>Fig. 1.3</b> Cavity celómica de un macho adulto de zebrafish .....	6
<b>Fig. 1.4</b> Cavity celómica de una hembra adulta de zebrafish .....	6
<b>Fig. 1.5</b> Esquema del ciclo vital del zebrafish .....	7
<b>Fig. 3.1</b> Tanques específicos para cruces individuales de zebrafish .....	12
<b>Fig. 3.2</b> Huevos de zebrafish recién fertilizados, recogidos en una placa petri .....	12
<b>Fig. 3.3</b> Tanque calentador utilizado para el cambio de temperatura .....	13
<b>Fig. 3.4</b> Esquema de las medidas tomadas .....	15
<b>Fig. 3.5</b> Eutanasia mediante shock térmico .....	16
<b>Fig. 3.6</b> Metodología de las mediciones .....	16
<b>Fig. 3.7</b> Necropsia de zebrafish .....	16
<b>Fig. 4.1</b> Resultados obtenidos del sexo histológico de la línea AB para cada grupo experimental .....	19
<b>Fig. 4.2</b> Resultados obtenidos del sexo histológico de la línea AB para cada grupo experimental .....	20
<b>Fig. 4.3</b> Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca del peso (g) entre las líneas AB y TU .....	22
<b>Fig. 4.4</b> Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca de la longitud total (cm) en las líneas AB y TU .....	23
<b>Fig. 4.5</b> Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca de la longitud estándar (cm) en las líneas AB y TU .....	24
<b>Fig. 4.6</b> Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca del ancho (cm) en las líneas AB y TU .....	25
<b>Fig. 4.7</b> Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca del índice de masa corporal en las líneas AB y TU .....	26
<b>Fig. 4.8</b> Gráfico comparativo del sexo fenotípico y del sexo histológico de la línea AB .....	27

<b>Fig. 4.9</b> Gráfico comparativo del sexo fenotípico y del sexo histológico de la línea TU	27
---	----

<b>Tabla 3.1</b> Diseño experimental des de los 0 a los 90 dpf	11
--	----

<b>Tabla 3.2</b> Características del pienso suministrado durante el experimento en función de las fases de desarrollo del zebrafish	14
---	----

<b>Tabla 3.3</b> Tabla recopilatorio de la mortalidad y el número final de individuos en el experimento	15
---	----

<b>Tabla 4.1</b> Número de machos y hembras de los grupos experimentales y sex ratio de los parentales de las líneas AB y TU	19
--	----

<b>Tabla 4.2</b> Resultados del promedio y la desviación estándar del peso en las líneas AB y TU	21
--	----

<b>Tabla 4.3</b> Resultados del promedio y la desviación estándar de la longitud total en las líneas AB y TU	22
--	----

<b>Tabla 4.4</b> Resultados del promedio y la desviación estándar de la longitud estándar en las líneas AB y TU	23
---	----

<b>Tabla 4.5</b> Resultados del promedio y la desviación estándar del ancho en las líneas AB y TU	24
---	----

<b>Tabla 4.6</b> Resultados del promedio y la desviación estándar del índice de masa corporal en las líneas AB y TU	25
---	----

## 1. Introducción

### 1.1. *Danio rerio*

El pez cebra o zebrafish (*Danio rerio*) (Fig. 1.1) es una especie de la familia de los ciprínidos (*Cyprinidae*), así como las carpas y los barbos, que proviene del sudeste asiático. Es la especie más utilizada en experimentación ya sea en campos como la genética, la neurofisiología o la biomedicina, además de ser una especie de uso frecuente en acuarios.



Fig. 1.1. Ejemplar adulto de zebrafish. Fuente: (*Research zebrafish - Danio rerio*, no date)

Son peces de agua dulce que se caracterizan por su pequeño tamaño, de 3 a 5 cm de largo y 1 cm de ancho en individuos adultos (De Tolla et.al., 1995). Deben su nombre, zebrafish, a su coloración, que sigue un patrón de 5 rayas azules uniformes que se extienden desde las branquias hasta el final de la aleta caudal y recuerdan a las rayas de una cebra. Esta sería la coloración más común aunque podemos encontrar diferentes tipos de libreas, tal y como se puede observar en la Fig. 1.2. Tienen una forma fusiforme y la boca súpera ya que se alimentan de los insectos que se encuentran en la zona superficial de la columna de agua.



Fig. 1. 2. Diferentes tipos de libreas de zebrafish. Fuente: (*Kalueff Lab - Science - Zebrafish Models*, no date)

La principal diferencia entre machos y hembras es que las hembras maduras tienen un abdomen más ancho debido a la formación de los ovocitos en los ovarios. Los machos en general suelen ser más estilizados y de colores más oscuros que las hembras, y tienen la aleta anal de un color más amarillento (Ruhl et al., 2009).

Las condiciones de crecimiento del zebrafish en su hábitat natural serían entre 22-30°C y un pH neutro (entorno a 7), mientras que en experimentación los valores que se requieren serían entre 27-29°C y un pH entre 7,2-7,4. En experimentación además de la temperatura y el pH, se tienen en cuenta otros parámetros como el oxígeno, la conductividad, compuestos nitrogenados o la alcalinidad, ya que pueden afectar en el desarrollo de esta especie (Harper & Lawrence, 2011).

#### *1.1.1. Reproducción*

La reproducción del zebrafish se produce mediante la puesta de los huevos y el esperma sobre un substrato (Ruhl et al., 2009). Una hembra generalmente produce alrededor de unos 100 huevos por puesta, aunque pueden producir desde unos pocos hasta miles de huevos (Reed & Jennings, 2011). En condiciones de laboratorio, las hembras pueden poner entre 200 y 300 huevos y el desarrollo embrionario tiene lugar en 24 - 36 horas (Kimmel et al., 1995). Esta especie sigue lo que se conoce como la estrategia de la r, es decir, después de la puesta los parentales no se hacen cargo de los huevos, debido al gasto energético que esto les supondría y que al ser presas no les sería rentable (Reed & Jennings, 2011). Al contrario que en otras especies, el zebrafish no necesita un cambio estacional para reproducirse. En condiciones de experimentación las hembras pueden llegar a poner cada dos o tres días y la puesta dura cerca de una hora (Matthews et al., 2002; Spence et al., 2006).

Como el comportamiento del zebrafish durante el apareamiento parece estar influenciado por la exposición de la pareja, el macho y la hembra están separados, pero viéndose, durante las 24 horas previas a la puesta (al amanecer). De esta manera, el macho es estimulado por las feromonas desprendidas por las gónadas femeninas para llevar a cabo un ritual de cortejo, conocido como la freza (Delaney et al., 2002).

Tal y como se muestra en la Fig. 1.3, el macho tiene los testículos bilaterales pares pegados a la vejiga, y van del cráneo al ano.

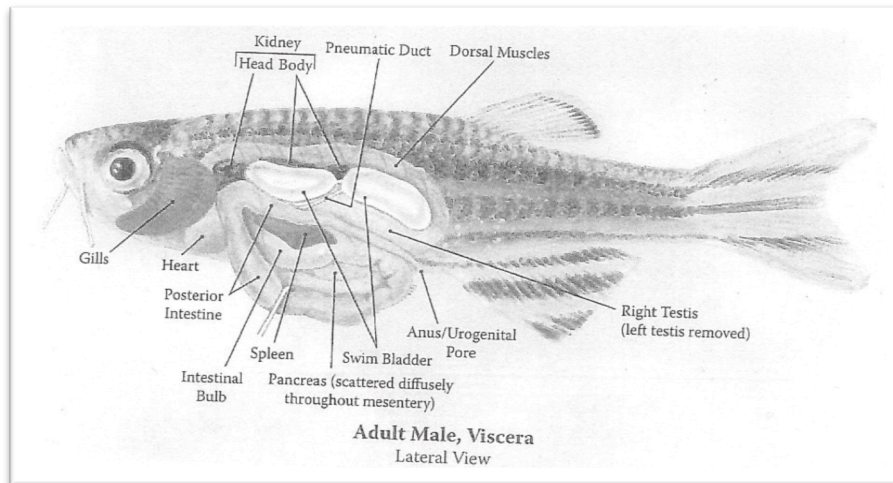


Fig. 1.3. Cavidad celómica de un macho adulto de zebrafish. (Harper & Lawrence, 2011)

Y tal y como se puede observar en la Fig. 1.4 en la hembra los ovarios son también bilaterales, tienen una conformación granulosa y pueden llegar a ser el 50% del peso del pez.

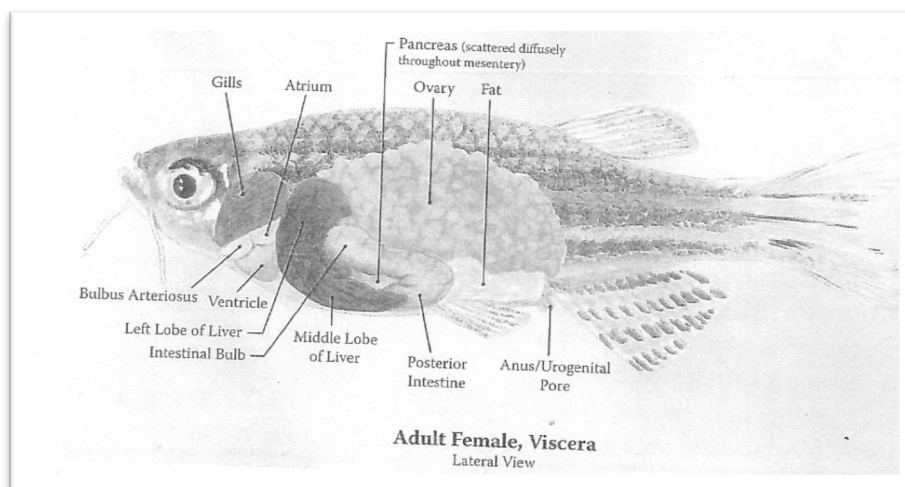


Fig. 1.4. Cavidad celómica de una hembra adulta de zebrafish. (Harper & Lawrence, 2011)

### 1.1.2. Desarrollo

Las diferentes etapas del ciclo de vida del zebrafish se han establecido como: embrión (de 0 a 72 horas post-fertilización, hpf), larva (de 72 horas a 13 días post-fertilización, dpf), juvenil (de 30 días a 3 o 4 meses) y adulto (una vez son sexualmente maduros) (Fleming, 2007). En la Fig. 1.5 se puede observar más detalladamente el ciclo vital del zebrafish desde las 0 horas hasta los 90 dpf.

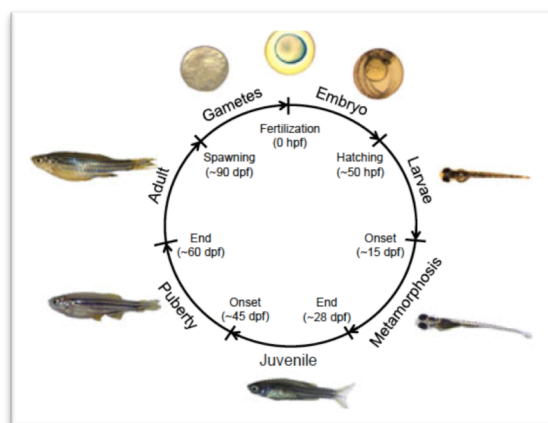


Fig.1.5. Esquema del ciclo vital del zebrafish. (Ribas & Piferrer, 2014)

Las larvas recién eclosionadas (a los 3 dpf, aproximadamente) están inactivas y tienen flotabilidad negativa, permaneciendo inmóviles en el fondo. A partir de los 5 dpf (normalmente relacionado con la temperatura del agua), las larvas hinchan sus vejigas natatorias subiendo a la superficie y cogiendo aire. A partir de ese momento tienen flotabilidad neutra y son capaces de moverse y mantenerse nadando bajo la columna de agua (Reed & Jennings, 2011). No es hasta los 6-7 dpf que se consideran animales de experimentación (Harper & Lawrence, 2011).

A partir de los 3 meses post eclosión, la velocidad de crecimiento disminuye y a los 18 meses dejan de crecer y se pueden considerar adultos maduros. Se ha observado que algunas líneas de laboratorio tienen una tasa de crecimiento más rápida, más dimorfismo sexual y un grado elevado de orientación sobre la superficie en comparación con poblaciones obtenidas directamente de su hábitat natural en la India (Reed & Jennings, 2011).

## 1.2. Usos actuales en experimentación

La popularidad del zebrafish como modelo en experimentación nació después de que George Streisinger y otros compañeros de la Universidad de Oregón, establecieran métodos que permitiesen la manipulación genética de esta especie (Harper & Lawrence, 2011).

En la actualidad, el zebrafish se usa principalmente en biología molecular, neurobiología y genética. Otros campos de estudio en los que se ha introducido el zebrafish recientemente serían estudios sobre cáncer, fisiología del sistema nervioso o estudios con drogas (Reed & Jennings, 2011).



### *1.2.1. Líneas genéticas para experimentación*

Las líneas genéticas de zebrafish que se usan en experimentación se pueden dividir en tres categorías: wild-type, mutante y transgénica (Harper & Lawrence, 2011).

Las líneas wild-type, son referidas como líneas estándar y en el caso del zebrafish son representativas del típico pez en términos de anatomía, fisiología y comportamiento. Estas líneas se utilizan normalmente para diferentes propósitos experimentales. Por ejemplo, las líneas AB y Tübingen (TU), las cuales se sometieron a la selección para eliminar mutaciones del fondo genético, ahora son las líneas que más se utilizan en investigación con zebrafish y se utilizan en la mayoría de estudios, incluyendo secuenciación, expresión de genes o transgénesis (Harper & Lawrence, 2011). Es probable que haya un grado de divergencia genética entre las muchas subpoblaciones de wild-type zebrafish (Lawrence, 2007) .

Una línea mutante de zebrafish es aquella que tiene una o más mutaciones y una línea transgénica es aquella a la que se le ha introducido deliberadamente ADN de otra especie. Gracias a la facilidad para crear estas líneas, mutantes y transgénicas, son utilizadas para estudiar varios aspectos de la biología de los vertebrados, incluyendo desarrollo de órganos, fisiología, enfermedades y comportamiento (Harper & Lawrence, 2011).

### *1.3. Determinación sexual*

La determinación sexual establece el destino sexual de un organismo e inicia la diferenciación de las gónadas. El método más estudiado de determinación sexual es la cromosómica (CSD), como en los mamíferos o las aves. Otro método de determinación sexual es la determinación sexual poligenética (PSD), donde los genes que tienen influencia en la determinación sexual están esparcidos por todo el genoma y la combinación de sus alelos determina el sexo de un individuo (Liew et al., 2012). El sexo también puede ser determinado por el ambiente y hay diversos factores que pueden afectar al sexo de un organismo. La temperatura es uno de los más estudiados pero también han sido estudiados el pH, la densidad de población, o la falta de oxígeno.

### 1.3.1. Determinación sexual en zebrafish

La determinación sexual del zebrafish es un tema muy estudiado y que todavía no tiene una única respuesta. Algunos estudios apuntan a que el zebrafish sigue una determinación sexual poligenética (PSD) (Liew et al., 2012), mientras que otros estudios apuntan a que el efecto del ambiente también influye en la determinación sexual (Sfakianakis et al., 2012; Hazlerigg et al., 2012; Brown et al., 2015). Es posible que la determinación sexual del zebrafish venga determinada poligenéticamente y que además el ambiente pueda influir en el sexo del individuo (Liew & Orbán, 2014).

El efecto ambiental más estudiado es la temperatura, aunque las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios podrían ser contradictorias, suponiendo que en ambos estudios utilicen la misma línea genética. Un estudio concluye que aplicando una temperatura más elevada (mayor de 30°C) durante la etapa de desarrollo de los 15 a los 25 días post eclosión (dpe) se obtiene un 68,8% de masculinización (Uchida *et al.*, 2004), mientras que otro estudio concluye que aplicando una temperatura más baja, 22°C, se obtiene un 87,1 % de masculinización (Sfakianakis *et al.*, 2012).

## 2. Objetivos

En experimentación siempre surgen problemas a la hora de tener poblaciones con igual número de hembras y de machos, aunque esto podría ser controlado si se conociera mejor el efecto que puede tener la temperatura sobre su determinación sexual. Es por este motivo que el principal objetivo de este estudio es observar el efecto de la temperatura en la determinación sexual del zebrafish durante las diferentes fases del desarrollo y también en diferentes líneas genéticas o líneas wild-type.

Debido a que el zebrafish es un modelo de experimentación, sólo se han estudiado las características que tienen aplicación para su uso en investigación y no las características más básicas del zebrafish. Y debido también a que el objetivo principal necesitaba la utilización de un número elevado de individuos, se ha querido estudiar el efecto que tiene la temperatura sobre el crecimiento, y algunas de las características del dimorfismo sexual de esta especie.

### 3. Materiales y métodos

La realización de este estudio se ha llevado a cabo en el animalario del Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (PRBB) y además se contó con la ayuda de Alejandro Valdivieso, investigador del Instituto de Ciencias del Mar (CSIC) para complementar el estudio llevando a cabo una revisión de los estudios más recientes sobre este tema hasta el día de hoy.

#### 3.1. Diseño experimental

Para reforzar los datos, se realizaron dos réplicas simultáneas del experimento descrito a continuación. Y para ver el efecto en diferentes líneas genotípicas de zebrafish, se realizó el experimento con líneas wild-type AB y TU. Las líneas AB y TU son líneas que inicialmente fueron cribadas para reducir la transmisión de mutaciones letales en embriones. Y lo que difiere en estas líneas es el fondo genético (Harper & Lawrence, 2011).

En cada réplica, se utilizó un acuario de 3L por cada grupo experimental, y en cada acuario se utilizaron 40 individuos. Por cada réplica se utilizaron un total de 200 individuos, y en todo el experimento se utilizaron 800 individuos.

El diseño experimental de este proyecto se ha basado en dividir el período de desarrollo de larvas de zebrafish (de los 15 a los 45 dpf) en tres rangos, de los 15 a los 25 (R1525), de los 25 a los 35 (R2535) y de los 35 a los 45 dpf (R3545). En cada uno de estos rangos se les aplicó una temperatura de 32°C y hasta los 90 dpf estuvieron entorno a 26-28°C. Para poder llevar a cabo una comparación del efecto que podría tener este cambio de temperatura, se hicieron dos grupos control, un control negativo que siempre estuvo a 26°C y otro grupo experimental que estuvo a 32°C de los 15 a los 45 dpf (R1545). A partir de los 45 dpf todos los grupos estuvieron a 26°C hasta los 90 dpf. A los 90 dpf se recogieron los datos tal y como se explica en el apartado 3.2. En la Tabla 3.1 se puede encontrar de forma esquemática el diseño experimental previamente explicado.

Tabla 3.1. Diseño experimental desde los 0 a los 90 dpf.

		Días post fertilización (dpf)					
		0-7	7-15	15-25	25-35	35-45	45-90
Grupo experimental	Control Negativo	Incubadora (27°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)				
	R1545	Incubadora (27°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)	Cambio de temperatura (32°C)			Sistema de recirculación (26-28°C)
	R1525	Incubadora (27°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)	Cambio de temperatura (32°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)		
	R2535	Incubadora (27°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)		Cambio de temperatura (32°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)	
	R3545	Incubadora (27°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)			Cambio de temperatura (32°C)	Sistema de recirculación (26-28°C)

A continuación se explican los materiales y métodos utilizados en cada fase para el desarrollo del experimento.

### 3.1.1. Cruce y puesta

Para obtener los individuos necesarios para este proyecto se prepararon 5 cruces, que se llevaron a cabo mediante unos tanques específicos para cruces individuales (un macho y una hembra). Estos tanques están compuestos por un tanque con rejilla para que los huevos puedan quedar separados de los parentales (Fig. 3.1.B), un tanque sin rejilla donde quedan los huevos (Fig. 3.1.A) y una pantalla para separar al macho de la hembra (Fig. 3.1.C). Los cruces se prepararon un día antes del día de obtención de los huevos y los parentales se dejaron separados hasta la mañana siguiente, cuando se levantó la pantalla y se puso el tanque con rejilla inclinado para favorecer la freza (apareamiento del zebrafish) (Fig. 3.1.D).

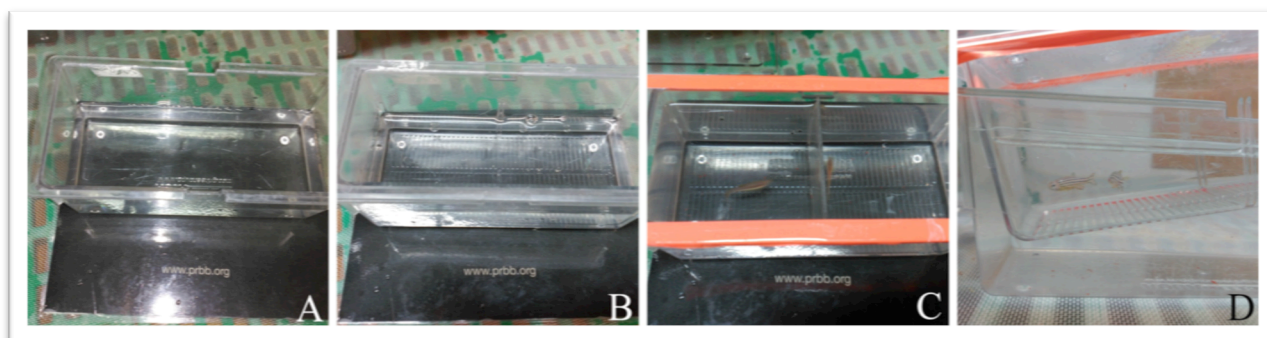


Fig. 3.1. Tanques específicos para cruces individuales de zebrafish. A. Tanque sin rejilla. B. Tanque con rejilla superpuesto en el tanque sin rejilla. C. Tanque de cruce con la pantalla que separa el macho de la hembra. D. Tanque de cruce levantado en el que se puede observar la freza.

Cuando los peces pusieron los huevos, se recogieron en placas de petri por separado (Fig. 3.2). Una vez ya estaban los huevos de cada cruce en una placa de petri, se contabilizaron y de cada pareja se cogieron 40 huevos, hasta un total de 200. Estos huevos se juntaron, se homogeneizaron y se repartieron en 5 placas (una placa por grupo) para disminuir la variabilidad de individuos. Una vez identificado cada grupo, se introdujeron en la incubadora, que los mantenía a 27°C. Hasta los 7 dpf estuvieron en la incubadora y a partir del día 8 se introdujeron en tanques de 3L listos para empezar el experimento, primero en el sistema de recirculación de la instalación del animalario y luego en el tanque calentador diseñado específicamente para el experimento. Este proceso se repitió para línea genotípica AB y para la línea TU.

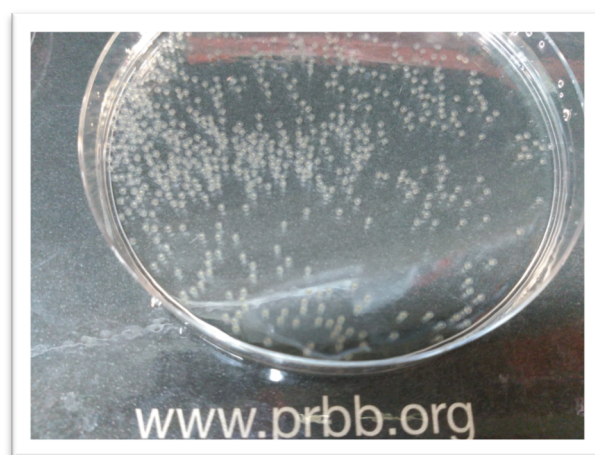


Fig. 3.2. Huevos de zebrafish recién fertilizados, recogidos en una placa de petri.

### 3.1.2. Cambio de temperatura

Para incrementar la temperatura del agua se creó un tanque calentador basado en un baño maría, es decir, mediante un calentador se aumentaba la temperatura del agua exterior y dentro de ésta se introducían los tanques. Este tanque calentador, tal y como

muestra la Fig. 3.3, está compuesto por un tanque grande con una salida para la recirculación de agua, un calentador de 240W con termostato para regular la temperatura de funcionamiento y dos tanques de 3L que contienen los peces con un termómetro analógico para controlar la temperatura.

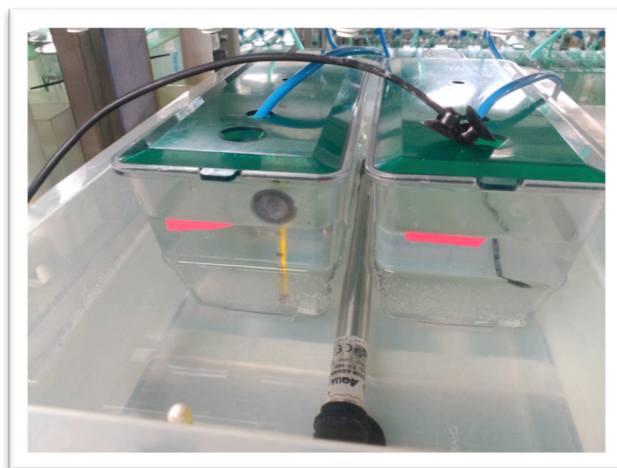


Fig. 3.3. Tanque calentador utilizado para el cambio de temperatura.

A los 15 dpf se introdujo el tanque del control negativo y el del rango de 15 a 25 dpf, y durante los 20 días que se realizó el experimento se iba cambiando el tanque del rango y se dejaba el del control negativo.

### 3.1.3. *Crecimiento*

En el desarrollo del zebrafish los requerimientos nutricionales van variando, tanto en términos cualitativos como cuantitativos. En la Tabla 3.2 se puede encontrar un resumen de las características que tenía el pienso que se suministró durante el experimento, en función de las fases de desarrollo. Durante la fase de larva, la alimentación debe ser rica en proteínas para favorecer el crecimiento y satisfacer los requerimientos energéticos. En la fase de juveniles siguen necesitando altos contenidos en proteínas porque siguen creciendo y madurando. Y en la fase de adultos se aumenta el contenido en vitaminas y el contenido en proteínas es menor ya que la velocidad de crecimiento disminuye. En esta fase el tamaño del pienso es recomendable que sea similar al de la fase anterior, ya que les facilita la digestión (Harper and Lawrence, 2011).

Tabla 3.2. Características del pienso suministrado durante el experimento en función de las fases de desarrollo del zebrafish.

		Características del Pienso		
		Composición	Tamaño	Frecuencia
Fases del desarrollo	Larvas (5 – 28 dpf)	55% proteínas 8% lípidos 8% fibras 9% cenizas 20% vitaminas	150 – 200 $\mu\text{m}$	5 veces/día
	Juveniles (28 – 60 dpf)	60% proteínas 16% lípidos 12% cenizas 12% vitaminas	400 – 600 $\mu\text{m}$	4 veces/día
	Adultos (>60 dpf)	50% proteínas 15% lípidos 12% cenizas 23% vitaminas	600 $\mu\text{m}$	4 veces/día

En la instalación en la que se ha llevado a cabo el proyecto, además de suministrarles el pienso, al final del día se les daba *Artemia salina*, un crustáceo que en sus primeros estadios son ricos en lípidos y ácidos grasos insaturados, lo cual lo hace muy adecuado como alimento vivo en acuicultura (Malpica Sánchez *et al.*, 2004).

### 3.2. Recogida de datos

Los datos se recogieron, tal y como muestra la Tabla 3.3, de un total de 186 individuos de la línea AB y 291 de la línea TU. La mortalidad de la línea TU es la esperada, según el seguimiento que se tiene de la línea en el animalario. En cambio la de la línea AB es mucho más elevada debido a una filtración de lejía en el sistema el día que eran introducidas al sistema. Por esta razón, se decidió seguir el experimento sin tener en cuenta la mortalidad.

Tabla 3.3. Tabla sobre la mortalidad y el número final de individuos en el experimento.

	N° individuos final		% Mortalidad	
	<i>Línea AB</i>	<i>Línea TU</i>	<i>Línea AB</i>	<i>Línea TU</i>
<b>Control Negativo</b>	21	62	73,7	22,5
<b>R1545</b>	42	66	47,5	17,5
<b>R1525</b>	38	51	52,5	36,2
<b>R2535</b>	37	59	53,7	26,2
<b>R3545</b>	48	53	40	33,7

Los datos que se recogieron fueron el sexo fenotípico, el peso, la longitud total (desde la cabeza hasta el final de la cola), la longitud estándar (de la cabeza hasta el principio de la cola), el ancho (tal y como se muestra en la Fig. 3.4) y el sexo histológico de cada individuo.

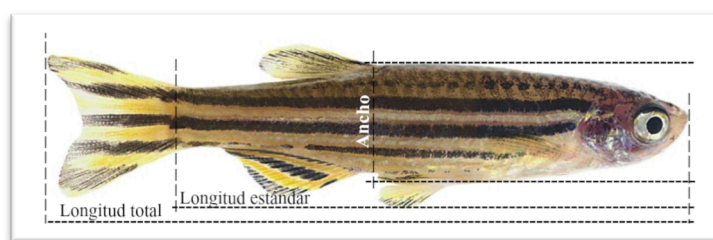


Fig. 3.4. Esquema de las medidas tomadas.

Fuente: (ZeRuth Lab Research - ZeRuth Lab at Murray State University, no date)

Para saber el sexo fenotípico se observó si el individuo tenía un bulto en la parte superior de la cabeza, ya que normalmente las hembras presentan un bulto. Otro aspecto que se tuvo en cuenta era si tenía el abdomen ancho, lo cual también sería indicativo de que es hembra. Y por último si movía rápidamente la aleta anal, indicativo de que es macho. Por ejemplo, en el individuo de la Fig. 3.4 no se observa el bulto, ni tampoco tiene el abdomen ancho, aunque faltaría ver si mueve la aleta anal se podría decir que es un macho. Para hacer estas observaciones se cogía un individuo y se colocaba en un tanque de 1L y se observaba si mostraba o no las características anteriores.

Después de observar el sexo fenotípico se eutanasiaba el individuo mediante shock térmico, es decir, se sumergía el individuo en un tanque con agua con hielo que estaba a una temperatura de entre 0 y 5°C durante 10 minutos tal y como se puede observar en la Fig. 3.5.



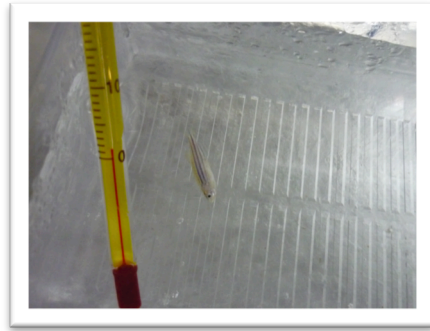


Fig 3.5. Eutanasia mediante shock térmico.

Una vez el individuo estaba eutanasiado, se secaba con un papel y se pesaba. Después, se midieron con un pie de rey la longitud total, la longitud estándar y el ancho del individuo (tal y como se puede observar en la Fig. 3.6).

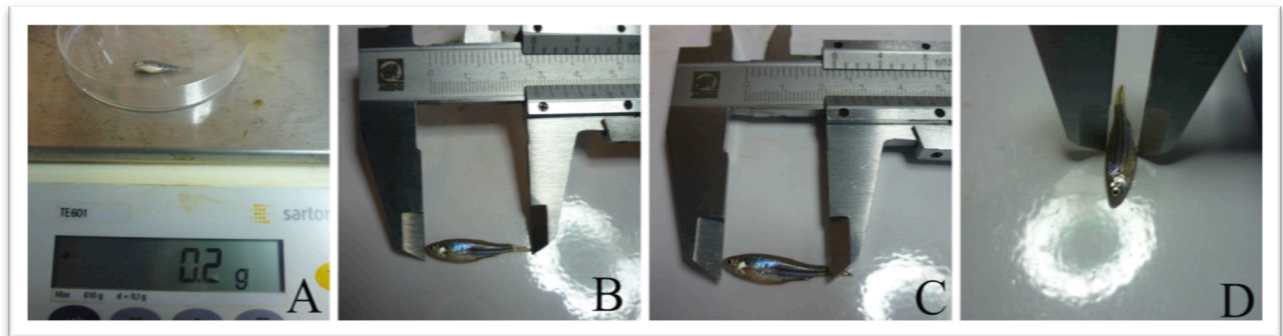


Fig. 3.6. Metodología de mediciones. A. Pesaje del individuo; B. Medición de la longitud total; C. Medición de la longitud estándar; D. Medición del ancho.

Por último se hacía la necropsia del individuo para poder determinar el sexo histológico. Se realizó bajo una lupa, utilizando unas tijeras y unas pinzas. Se les determinaba en la cavidad celómica la presencia de testículos (Fig 3.7.A) u ovarios (Fig. 3.7.B).

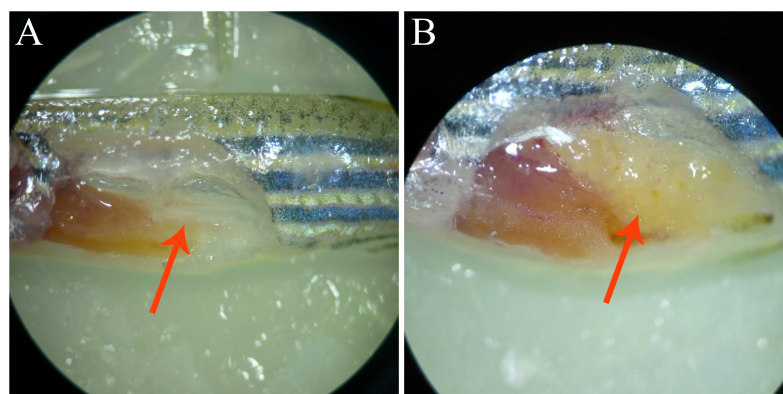


Fig. 3.7. Necropsia de zebrafish. A. Macho. B. Hembra.

### 3.3. Análisis de datos

En este apartado se pretende explicar los cálculos realizados para, posteriormente, poder comparar los resultados obtenidos. Todos los cálculos y gráficas fueron realizados con el programa Excel.

#### 3.3.1. Determinación sexual

Los resultados de la determinación sexual se relacionan con los resultados obtenidos acerca del sexo histológico de los individuos. Para poder comparar los resultados de los diferentes grupo se calculó el sex ratio, es decir, el porcentaje de machos y hembras respecto a la población total de cada grupo.

#### 3.3.2. Crecimiento

Para poder comparar los datos sobre el peso, la longitud o el ancho de los diferentes grupos, se calculó el promedio de cada grupo utilizando la ecuación 1, donde  $X_i$  es el valor del peso, longitud o ancho del individuo “i”, y n es la población total del grupo.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (1)$$

Para ver la relación entre la longitud total y el peso, se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) de cada individuo siguiendo la ecuación 2. Posteriormente, para poder comparar los resultados de los diferentes grupos se calculó el promedio del IMC de cada grupo siguiendo la ecuación 3, donde  $IMC_i$  es el valor de IMC para el individuo “i” y n es el número total de individuos del grupo. En la Fig.4.7 se pueden observar los resultados obtenidos del promedio del IMC para cada grupo.

$$IMC = \frac{peso}{(longitudtotal)^3} \quad (2)$$

$$\overline{IMC} = \frac{\sum_{i=1}^n IMC_i}{n} \quad (3)$$

Además de estos cálculos, para ver la variabilidad de los resultados se calculó la desviación estándar de los datos de cada grupo.

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (4)$$

### 3.3.3. *Dimorfismo Sexual*

Para ver si las características del dimorfismo sexual estudiadas sirven para diferenciar machos y hembras de forma visual se han utilizado los resultados del sexo fenotípico y del sexo histológico del control positivo, y se ha calculado el sex ratio con dichos resultados de las dos líneas

## 4. Resultados y discusión

En los siguientes apartados se recogen los resultados obtenidos de la realización de este proyecto así como el análisis que se ha hecho de los datos. Para simplificar, en los gráficos se refiere R1545 como el grupo que estuvo a 32°C del 15 al 45 dpf, R1525 como el grupo que estuvo a 32°C del 15 al 25 dpf, R2535 como el grupo que estuvo a 32°C del 25 al 35 dpf y R3545 como el grupo que estuvo a 32°C del 35 al 45 dpf.

En todos los apartados siguientes sería conveniente la utilización de métodos de estadística inferencial, realizando test que nos permitan ver si realmente las diferencias entre los resultados son significativas.

### 4.1. Determinación sexual

Los resultados obtenidos sobre el sexo histológico en ambas líneas, se recogen en la Tabla 4.1. En esta tabla podemos observar el número de machos y hembras de cada grupo al final del experimento. Además, se muestra el sex ratio de los parentales que se observó para hacer una estimación de lo que se esperaría que saliese en el control negativo.

Tabla 4.1. Número de machos y hembras de los grupos experimentales y sex ratio de los parentales de las líneas AB y TU.

	Línea AB		Línea TU	
	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
<b>Control negativo</b>	12	9	45	17
<b>R1545</b>	30	12	47	19
<b>R1525</b>	25	13	44	7
<b>R2535</b>	19	18	50	9
<b>R3545</b>	29	19	39	14
<b>Parentales</b>	43 (59%)	30 (41%)	63 (84%)	12 (16%)

En la línea AB, los resultados obtenidos, mostrados de forma gráfica en la Fig. 4.1, se observa que el control negativo tiene un valor similar al de los parentales. Si referimos los valores de los grupos al control negativo, vemos que al aplicar el cambio de temperatura durante toda la fase de desarrollo hay un aumento del 14,3% en el porcentaje de machos (masculinización). En cambio, al hacerlo en diferentes rangos dentro de la fase de desarrollo vemos que tiene más efecto en los diez primeros días de la fase de desarrollo (R1525) con un 65,8% de machos, mientras que los otros dos grupos, R2535 con un 51,4% de machos y R3545 con un 60,4% de machos, tienen valores cercanos a los del control negativo, con lo que el incremento de temperatura parece no haber afectado a la determinación sexual.

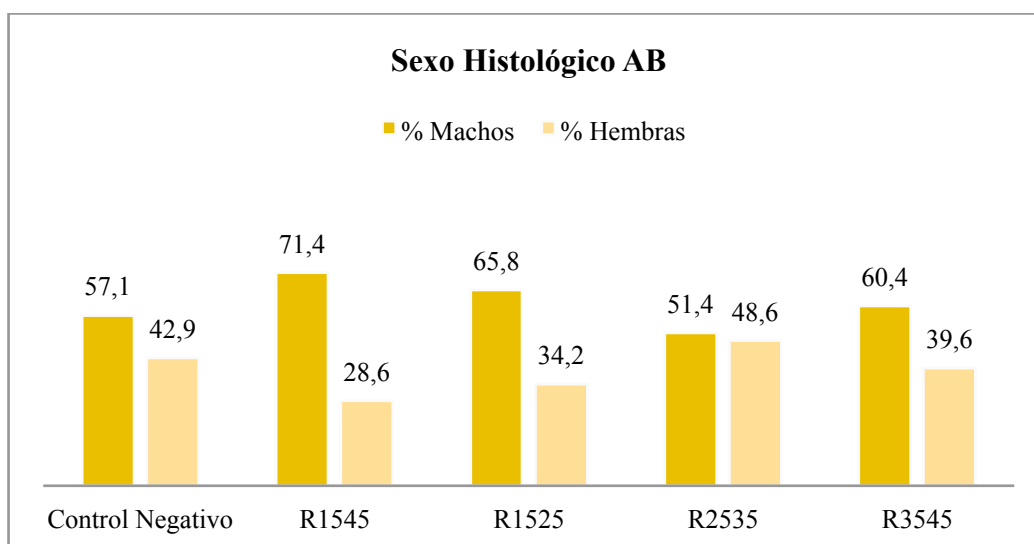


Fig. 4.1. Resultados obtenidos del sexo histológico de la línea AB para cada grupo experimental. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

En el caso de la línea TU (Fig. 4.2) se observa que el control negativo en comparación con el valor de los parentales (Tabla 4.1) tiene un 6,3% más de machos. Esto nos muestra que los resultados parecen ser al contrario que en el caso de los AB, es decir, en este caso cuando incrementamos la temperatura durante toda la fase de desarrollo (R1545) vemos que el porcentaje de hembras aumenta (feminización), a pesar de que el porcentaje de machos siempre es superior al 50%. Además vemos que en el R1525 y R2535 los valores están cercanos a los de los parentales, la cual cosa nos diría no afecta demasiado la temperatura.

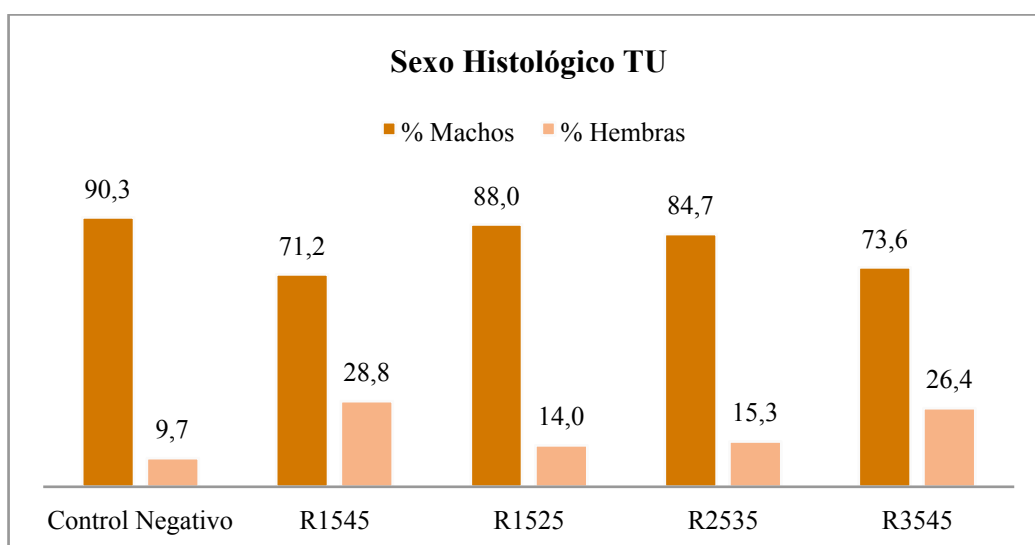


Fig. 4.2. Resultados obtenidos del sexo histológico de la línea TU para cada grupo experimental. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

En comparación con los artículos mencionados anteriormente, y que inspiraron este proyecto, los resultados de la línea AB parecen decantarse hacia los de Uchida et.al., 2004 ya que aquí se obtiene un 57,1% de masculinización al aumentar la temperatura y ellos concluían un 68,8%. Pero esto solo sería cierto si la línea que utilizó este estudio fue AB, ya que esto no se menciona en el artículo, solo se dice que fue una línea wild-type. Los resultados de la línea TU en cambio, no encajan con ninguno de los resultados que concluyen en dichos artículos.

## 4.2. Crecimiento

Como en todas las especies poiquilothermas, en el zebrafish el metabolismo aumenta con la temperatura (Harper and Lawrence, 2011). A continuación se muestran los resultados obtenidos en relación al efecto de la temperatura sobre los diferentes parámetros de crecimiento del zebrafish.

### 4.2.1. Peso

En la Tabla 4.2 se recogen los resultados del promedio y la desviación estándar de cada grupo y línea con los que se ha realizado la Fig. 4.3. La desviación estándar de la línea AB es superior a la de la línea TU, pero dentro de la línea es similar.

Tabla 4.2. Resultados del promedio y la desviación estándar del peso en las líneas AB y TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

Resultados sobre el peso (g)		Control Negativo	R1545	R1525	R2535	R3545
Línea AB	Promedio (g)	0,314	0,228	0,225	0,279	0,245
	Desviación Estándar	0,142	0,126	0,178	0,143	0,167
Línea TU	Promedio (g)	0,135	0,126	0,178	0,143	0,167
	Desviación Estándar	0,052	0,051	0,051	0,051	0,056

Como se puede observar en la Fig. 4.3 en la línea AB el peso es más elevado que en la línea TU. Podemos observar que en la línea AB el peso de R1525 (0,225g), R2535 (0,279g), R3545 (0,245g) y R1545 (0,228g) es menor que en el control negativo (0,314g). Mientras que en la línea TU el peso de R1525 (0,178g), R2535 (0,143g), R3545 (0,167g) es más elevado que en el control negativo, y el grupo R1545 (0,126g) es el que tiene un peso menor.

Si observamos las barras de error con desviación estándar de la Fig. 4.3 y los valores de la Tabla 4.2, vemos que en la línea AB la dispersión de los valores es mayor y por tanto las comparaciones no serían del todo representativas.

Debido al aumento del metabolismo y que la cantidad de pienso ha sido la misma para todos los grupos, se podría decir que se ve que un incremento de la temperatura hace que los individuos tengan un peso menor, ya que en ambas líneas el grupo R1545 tiene un peso menor que el control negativo.

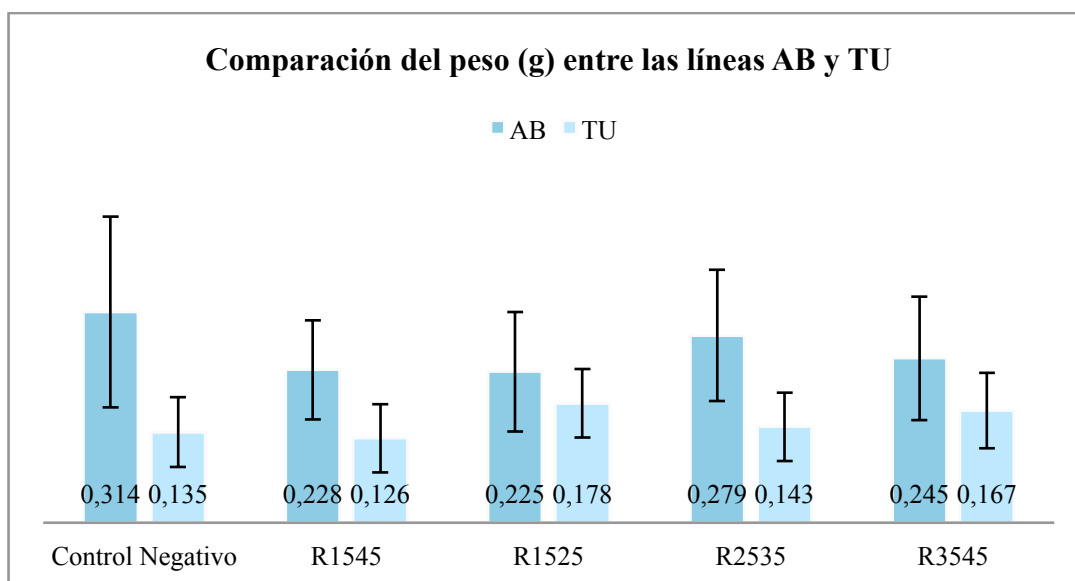


Fig. 4.3. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca del peso (g) entre las líneas AB y TU. Incluye barras de error con desviación estándar.

#### 4.2.2. Longitud

En las Tablas 4.3 y 4.4 se recogen los resultados del promedio y la desviación estándar de cada grupo y línea con los que se han realizado las Fig. 4.4 y 4.5.

Tabla 4.3. Resultados del promedio y la desviación estándar de la longitud total en las líneas AB y TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

Resultados sobre la longitud total (cm)		Control Negativo	R1545	R1525	R2535	R3545
Línea AB	Promedio (g)	2,957	2,894	2,967	3,101	2,874
	Desviación Estándar	0,385	0,272	0,281	0,273	0,366
Línea TU	Promedio (g)	2,394	2,457	2,573	2,534	2,557
	Desviación Estándar	0,301	0,261	0,271	0,252	0,254

Tabla 4.4. Resultados del promedio y la desviación estándar de la longitud estándar en las líneas AB y TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

Resultados sobre la longitud estándar (cm)		Control Positivo	Control Negativo	R1525	R2535	R3545
Línea AB	Promedio (g)	2,343	2,3	2,376	2,497	2,265
	Desviación Estándar	0,339	0,351	0,265	0,269	0,339
Línea TU	Promedio (g)	1,864	1,974	2,033	2,035	1,986
	Desviación Estándar	0,264	0,217	0,241	0,216	0,223

Como se puede observar en la Fig. 4.4 y la Fig. 4.5 no hay mucha variación entre la longitud promedio de los grupos, en ninguna de las dos líneas. A pesar de que sí que se puede observar que los valores de la línea TU son menores que en la línea AB, tanto para la longitud total como la longitud estándar.

En referencia a las barras de error de las figuras 4.4 y 4.5 vemos que los valores de la desviación estándar son similares en todos los grupos por lo que la dispersión de valores también es similar.

Debido a que los valores de las longitudes no varían mucho entre los diferentes grupos podríamos decir que la longitud no se ve afectada por un aumento de la temperatura.

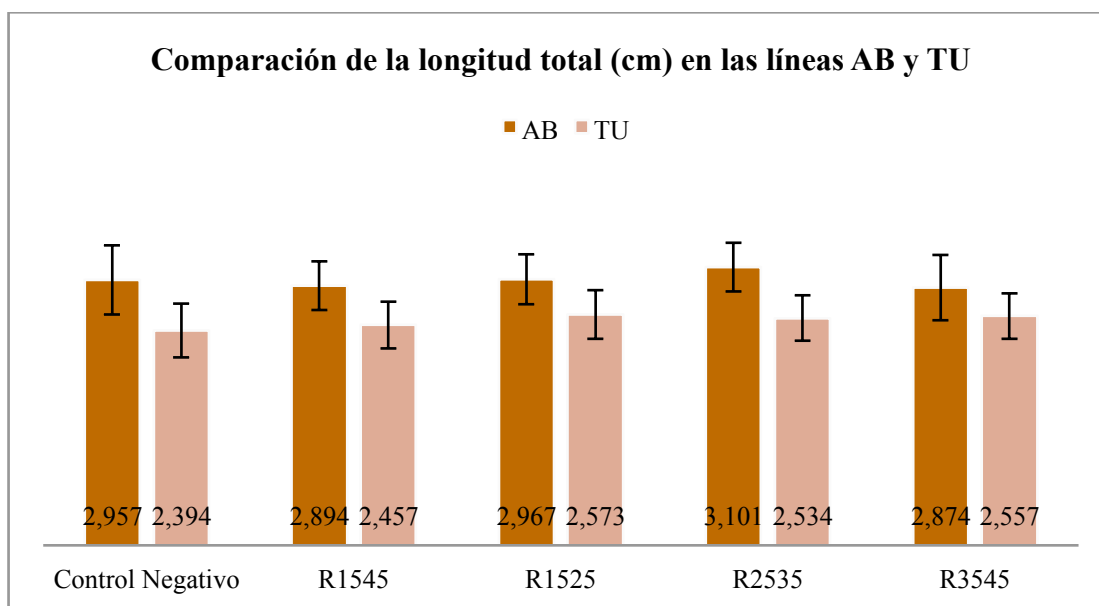


Fig. 4.4. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca de la longitud total (cm) en las líneas AB y TU. Incluye barras de error con desviación estándar.



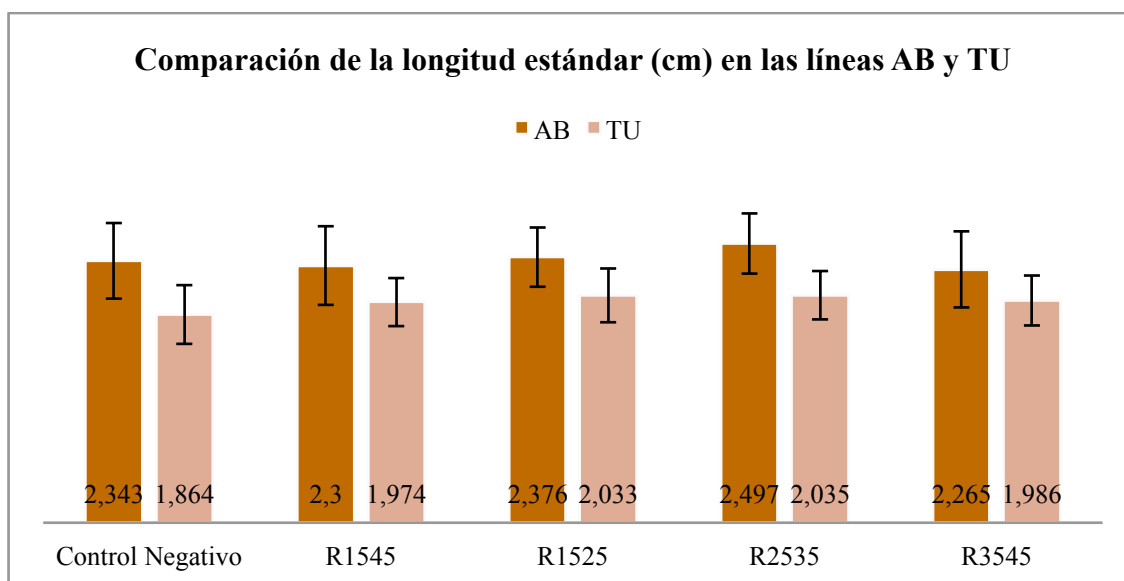


Fig. 4.5. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca de la longitud estándar (cm) en las líneas AB y TU. Incluye barras de error con desviación estándar.

#### 4.2.3. Ancho

En la Tabla 4.5 se recogen los resultados del promedio y la desviación estándar de cada grupo y línea con los que se han realizado las Fig. 4.6.

Tabla 4.5. Resultados del promedio y la desviación estándar del ancho en las líneas AB y TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

Resultados sobre el ancho (cm)		Control Negativo	R1545	R1525	R2535	R3545
Línea AB	Promedio (g)	0,328	0,429	0,534	0,515	0,427
	Desviación Estándar	0,125	0,179	0,106	0,162	0,191
Línea TU	Promedio (g)	0,329	0,462	0,392	0,449	0,373
	Desviación Estándar	0,162	0,086	0,128	0,084	0,132

Como se puede observar en la Fig. 4.6 la línea AB parece que cuanto más tarde se aplica el incremento de temperatura, menor es el ancho, y en el grupo R1545 se puede observar que aumenta respecto al control negativo. Mientras que en la línea TU los valores son siempre más altos que en el control negativo.

Estos resultados parecen poco coherentes ya que, si el número de hembras disminuye (que suelen ser más anchas) y el peso también es más bajo en todos los

grupos menos en el grupo R1545, no deberían tener valores más altos que el control negativo.

Además, vemos que los valores de la desviación estándar y las barras de error de la Fig. 4.6 nos muestran que hay mucha dispersión en los resultados sobretodo en el R3545 de la línea TU.

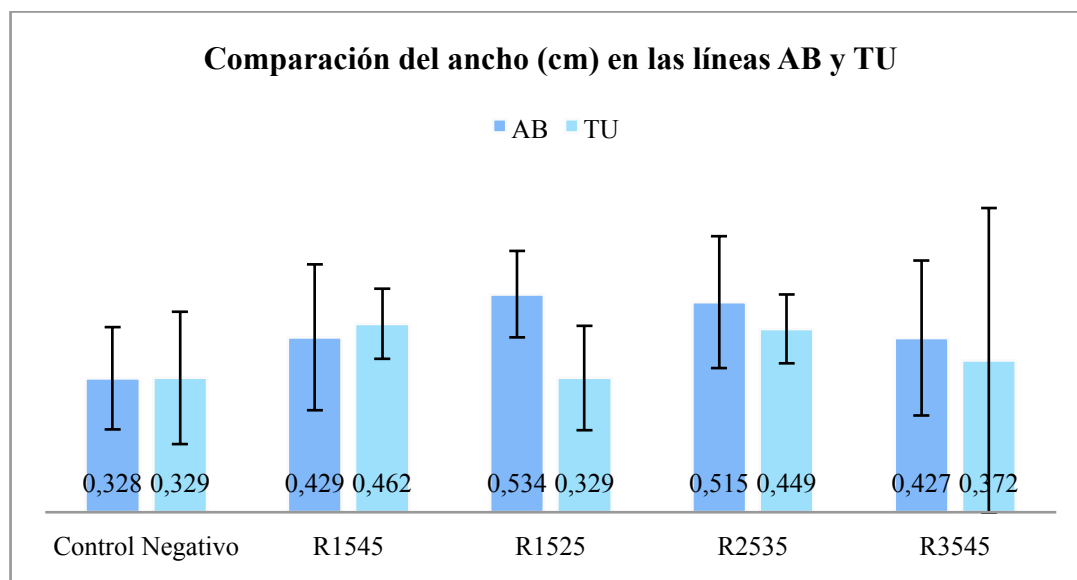


Fig. 4.6. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos acerca del ancho (cm) en las líneas AB y TU de cada grupo experimental. Incluye barras de error con desviación estándar.

#### 4.2.4. Índice de Masa Corporal (IMC)

En la Tabla 4.6 se recogen los resultados del promedio y la desviación estándar de cada grupo y línea con los que se han realizado las Fig. 4.7.

Tabla 4.6. Resultados del promedio y la desviación estándar del índice de masa corporal en las líneas AB y TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

Resultados sobre el IMC		Control Negativo	R1545	R1525	R2535	R3545
Línea AB	Promedio (g)	1,214	0,941	0,861	0,936	1,032
	Desviación Estándar	0,251	0,217	0,227	0,226	0,263
Línea TU	Promedio (g)	0,984	0,849	1,045	0,879	0,999
	Desviación Estándar	0,407	0,249	0,274	0,281	0,328

En ambas líneas el grupo R1545 tiene un valor más bajo que el control negativo, pero en los demás grupos, en la línea AB el valor del IMC es más alto cuanto más tarde

se aplica el incremento de temperatura y en la línea TU, el valor del IMC es más alto en los primeros diez días de la fase de desarrollo.

Si observamos las barras de error de la Fig. 4.7 vemos que la dispersión de los valores es elevada y que por tanto, estos dentro de cada grupo varían.

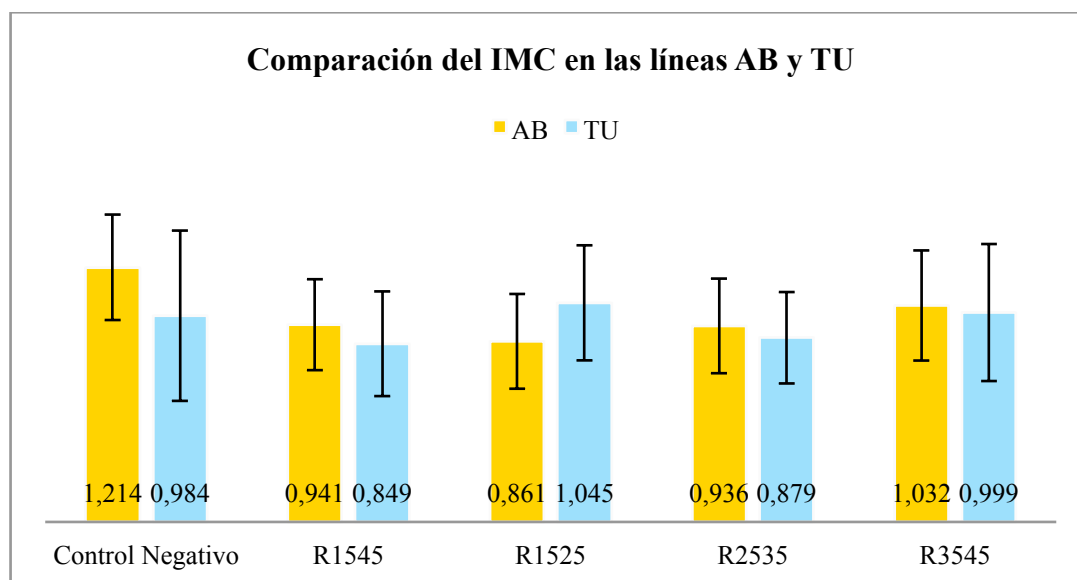


Fig. 4.7. Gráfico comparativo de los resultados obtenidos sobre el Índice de Masa Corporal de cada grupo. Incluye barras de error con desviación estándar.

### 4.3. Dimorfismo sexual

En la Fig. 4.8 se puede observar que el porcentaje de machos y hembras de la línea AB en el sexo fenotípico se aproxima al del sexo histológico, la diferencia es de un 5,6%. Mientras que en la Fig. 4.9 se puede observar que el porcentaje de machos y hembras de la línea TU es bastante diferente en el sexo fenotípico respecto del histológico, con una diferencia del 18,8%.

Esto puede ser debido a que en la línea AB las características que se utilizan para saber si un individuo es macho o hembra si que son representativas, mientras que en la línea TU estas características no son del todo útiles para diferenciar el sexo.

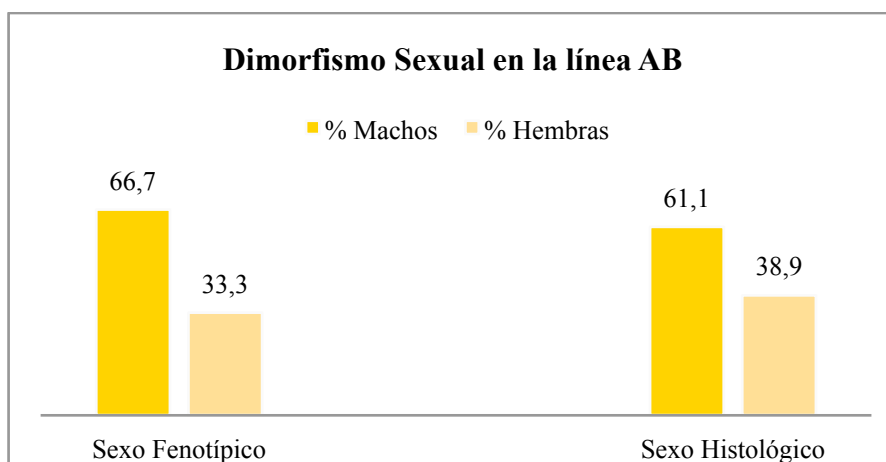


Fig. 4.8. Gráfico comparativo del sexo fenotípico y del sexo histológico de la línea AB. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

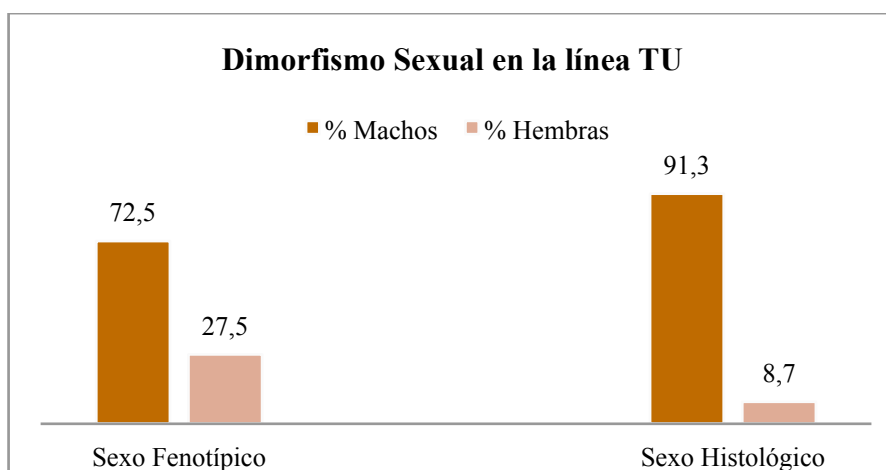


Fig. 4.9. Gráfico comparativo del sexo fenotípico y del sexo histológico de la línea TU. El número de individuos evaluados se encuentra en la Tabla 4.1.

## 5. Conclusiones

El estudio ha permitido observar el efecto de la temperatura en la determinación sexual, así como en el peso y crecimiento del zebrafish. Además ha permitido observar las características del dimorfismo sexual que se utilizan para diferenciar el sexo en esta especie.

Se han comparado los resultados anteriores y se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Como ya se ha mencionado anteriormente, se debería realizar test estadísticos que permitieran verificar si los efectos observados son realmente significativos para poder obtener conclusiones verídicas.
- Aplicar 32°C durante la fase de desarrollo tiene efecto en la determinación sexual, aunque este efecto parece ser leve ya que en la línea AB sí que se observa una tendencia a la masculinización con el incremento de la temperatura. En cambio, la línea TU parece tener una tendencia a la feminización, y podría venir dado a que en condiciones normales suele haber más machos que hembras.
- El hecho de aplicar un incremento de temperatura en un momento u otro de la fase de desarrollo no afecta a la determinación sexual, es más, se ha observado que si se aplica en toda la fase de desarrollo (de los 25 a los 45 dpf) el efecto (masculinización o feminización) es mayor.
- Un incremento de la temperatura del agua durante la fase de desarrollo no afecta en la longitud total, ni en la longitud estándar. En relación al peso, al tener una elevada desviación estándar hace que los valores sean similares en todos los grupos, por lo cual tampoco se vería que la temperatura afectase a este parámetro. Lo mismo sucede con el IMC, los valores del promedio observados con la desviación estándar no varían entre los diferentes grupos. En cuanto al ancho, los resultados obtenidos no son coherentes y por lo tanto, no concluyentes.
- Se puede concluir que las características del dimorfismo sexual que se han observado en este estudio (ancho, bulto y aleta anal) permiten diferenciar machos y hembras en la línea AB, mientras que en la línea TU, estas mismas características no han permitido diferenciar entre machos y hembras.

## 6. Bibliografía

### 6.1. Referencias bibliográficas

Brown, A. R., Owen, S. F., Peters, J., Zhang, Y., Soffker, M., Paull, G. C., Hosken, D. J., Wahab, M. A. and Tyler, C. R. (2015) 'Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 112(11), pp. E1237–E1246. doi: 10.1073/pnas.1416269112.

Delaney, M., Follet, C., Ryan, N., Hanney, N., Lusk-Yablick, J. and Gerlach, G. (2002) 'Social interaction and distribution of female zebrafish (*Danio rerio*) in a large aquarium.', *The Biological bulletin*. Marine Biological Laboratory, 203(2), pp. 240–241.

Harper, C. and Lawrence, C. (2011) *The laboratory zebrafish*. CRC Press.

Hazlerigg, C. R. E., Lorenzen, K., Thorbek, P., Wheeler, J. R. and Tyler, C. R. (2012) 'Density-dependent processes in the life history of fishes: Evidence from laboratory populations of zebrafish *Danio rerio*', *PLoS ONE*, 7(5), pp: e37550. doi: 10.1371/journal.pone.0037550.

*Kalueff Lab - Science - Zebrafish Models* (no date). Available at: <http://www.kaluefflab.com/zebrafish.html>.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish.', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), pp. 253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.

Lawrence, C. (2007) 'The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review', *Aquaculture*, 269(1–4), pp. 1–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.

Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., Orban, L. (2012) 'Polygenic Sex Determination System in Zebrafish', *PLoS ONE*. Edited by B. Alsina. Public Library of Science, 7(4), pp. e34397. doi: 10.1371/journal.pone.0034397.

Liew, W. C. and Orbán, L. (2014) 'Zebrafish sex: a complicated affair.', *Briefings in functional genomics*, 13(2), pp. 172–87. doi: 10.1093/bfgp/elt041.

- Malpica Sánchez, A., Castro Barrera, T., Sandoval Trujillo, H., Castro Mejía, J., De Lara Andrade, R. and Castro Mejía, G. (2004) 'Composición del contenido de ácidos grasos en tres poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* de aguas epicontinentales', *Revista de Biología Tropical*.  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>, 52(1), pp. 297–300.
- Matthews, M., Trevarrow, B. and Matthews, J. (2002) 'A virtual tour of the Guide for zebrafish users.', *Lab animal*, 31(3), pp. 34–40. doi: 10.1038/5000140.
- Reed, B. and Jennings, M. (2011) 'Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*', *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*, pp. 1–27.
- Research zebrafish - Danio rerio* (no date). Available at:  
<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/zebrafish>.
- Ribas, L. and Piferrer, F. (2014) 'The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research', *Reviews in Aquaculture*, 6(4), pp. 209–240. doi: 10.1111/raq.12041.
- Ruhl, N., McRobert, S. P. and Currie, W. J. S. (2009) 'Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*).', *Lab animal*, 38(8), pp. 264–9. doi: 10.1038/labon0809-264.
- Sfakianakis, D. G., Leris, I., Mylonas, C. C. and Kentouri, M. (2012) 'Temperature during early life determines sex in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)', *Journal of Biological Research*, 17, pp. 68–73.
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F. and Smith, C. (2006) 'The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh', *Journal of Fish Biology*, 69(5), pp. 1435–1448. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. and Iguchi, T. (2004) 'An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal.', *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 137(1), pp. 11–20.

*ZeRuth Lab Research - ZeRuth Lab at Murray State University* (no date). Available at:  
<https://sites.google.com/a/murraystate.edu/zeruth-lab/home>.